

Rec'd PTO 23 SEP 2004

PCT/ E S 03 / 00 1 4 0

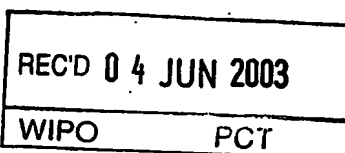
1 509194



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



Oficina Española
de Patentes y Marcas



CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200200716, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 26 de Marzo de 2002.

Madrid, 24 de abril de 2003

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

M^a DEL MAR BIARGE MARTÍNEZ

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTANCIA DE SOLICITUD



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NUMERO DE SOLICITUD

P20 0200716

02 MAR 26 10:57

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN
MADRID

CÓDIGO
28

(1) MODALIDAD

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN:
MODALIDAD

NUMERO SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE(S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAIS

DNI/CIF

CNAE PYME

ALEMANY BONASTRE
CASCALLO PIQUERAS

RAMON
MANEL MARIA

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

ES
ES

35101126K
43690630Z

(8) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO AV. GRAN VIA s/n. Km.2,7

LOCALIDAD L'HOSPITALET DE LLOBREGAT

PROVINCIA BARCELONA

PAIS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELEFONO

FAX

CORREO ELECTRONICO

CÓDIGO POSTAL 08907

CÓDIGO PAIS ES

CÓDIGO NACION ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO
PAIS

ALEMANY BONASTRE
CASCALLO PIQUERAS

RAMON.
MANEL MARIA

(8)

☒ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☐ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☐ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(9) TÍTULO DE LA INVENCION

"EL USO DE ADENOVIRUS MUTADOS EN LOS GENES VA PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER"

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☐ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:
PAIS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAIS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/88 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

ISERN JARA, JORGE, 733/1, AVDA. DIAGONAL, 463 BIS 2, BARCELONA, , 08036

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN. Nº DE PÁGINAS: 31

☒ Nº DE REVINDICACIONES: 2

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 6

☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 0

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☒ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☐ OTROS:

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

JORGE ISERN JARA

Colegiado Nº 515

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN DE PAGO DE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

MOD.31011 - 1 - EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



RESUMEN Y GRÁFICO

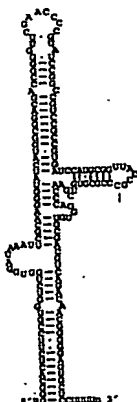
RESUMEN (Máx. 150 palabras)

EL USO DE ADENOVIRUS MUTADOS EN LOS GENES VA PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER.

La presente invención se refiere a la utilización de un adenovirus para el tratamiento del cáncer caracterizado por el hecho que el adenovirus es defectivo en sus ARNs virus asociados (VA), dicho adenovirus tiene una mutación en la secuencia del gen VAI ó VAII o ambos. Este adenovirus también puede tener una mutación en las secuencias que controlan la expresión de los ARNs VA.

GRÁFICO

FIGURA 1



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21 NÚMERO DE SOLICITUD
P20 020 0716

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAIS

22 FECHA DE PRESENTACIÓN

62 PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

71 SOLICITANTE (S)

RAMON ALEMANY BONASTRE, MANEL MARIA CASCALLO PIQUERAS

DOMICLIO AV. GRAN VIA s/n. Km.2,7
L'HOSPITALET DE LLOBREGAT

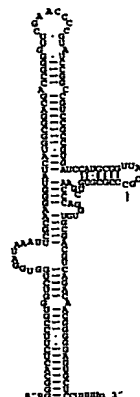
NACIONALIDAD ESPAÑOLA
08907 BARCELONA ESPAÑA

72 INVENTOR (ES)

RAMON ALEMANY BONASTRE, MANEL MARIA CASCALLO PIQUERAS

51 Int. Cl.

GRÁFICO (S) FIGURA 1



54 TÍTULO DE LA INVENCION

"EL USO DE ADENOVIRUS MUTADOS EN LOS GENES VA PARA EL
TRATAMIENTO DEL CANCER"

57 RESUMEN

EL USO DE ADENOVIRUS MUTADOS EN LOS GENES VA PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER.

La presente invención se refiere a la utilización de un adenovirus para el tratamiento del cáncer caracterizado por el hecho que el adenovirus es defectivo en sus ARNs virus asociados (VA), dicho adenovirus tiene una mutación en la secuencia del gen VAI ó VAII o ambos. Este adenovirus también puede tener una mutación en las secuencias que controlan la expresión de los ARNs VA.

1. Campo de la invención

El campo de la invención está relacionado en términos generales con el campo de la biología tumoral. En particular la invención se refiere a adenovirus mutados en los genes de VA RNAs y su uso para inhibir el cáncer.

5

2. Descripción del arte relacionado con la invención

El tratamiento actual del cáncer se basa principalmente en la quimioterapia, radioterapia y cirugía. Pese a una elevada tasa de curación para el cáncer en estadios tempranos, la mayoría de casos avanzados de

10 cáncer son incurables porque no pueden ser extirpados quirúrgicamente o porque las dosis radio o quimioterapéuticas administradas se ven limitadas por su toxicidad en células normales. La transferencia de material genético para inhibir o destruir tumores supone una alternativa terapéutica muy prometedora (Roth and Cristiano, 1997). Comparada con las estrategias convencionales

15 esta estrategia de terapia génica busca ser más específica para las células malignas atacando los defectos genéticos de las células tumorales. Existen varias estrategias que usan ADN como agente terapéutico: la transferencia de genes que estimulan respuestas inmunes antitumorales, la transferencia de genes tóxicos o que activan la toxicidad de drogas, y la transferencia de ADN

20 para bloquear o restablecer la expresión de genes involucrados en el desarrollo de tumores (oncogenes, genes supresores tumorales, genes antiangiogénicos, etc).

Además del ADN terapéutico, el otro componente de la terapia génica es el vehículo que transporta este ADN: el vector. Para aumentar la

25 transferencia de ADN a las células diana se ha usado vectores sintéticos y derivados de virus. Estos últimos son en general más eficientes para transferir ADN o "transducir" células tumorales. De entre distintos tipos de virus se han desarrollado vectores virales a partir de retrovirus, Herpes Simplex virus, virus adeno-asociado y adenovirus entre otros. En terapia génica del cáncer el

30 adenovirus se ha usado preferentemente por su elevada capacidad de infectar

células epiteliales, que suponen el origen de la mayoría de tumores sólidos (Alemany et al., 1999; Zhang, 1999). Otras ventajas de los vectores adenovirales son que pueden transferir el ADN a células que no están en división, que el ADN del vector no se integra en el genoma de la célula transducida, que estos vectores se pueden purificar hasta concentraciones de 10^{13} partículas virales por mililitro y que son estables en el torrente circulatorio por carecer de envueltas lipídicas.

El adenovirus es un virus de ADN sin envuelta lipídica caracterizado por presentar una cápside icosaédrica que empaqueta un ADN lineal de doble cadena de aproximadamente 36 kilobases (Shenk, 1996). Los principales componentes de la cápside son el hexón, que forma las caras del icosaedro, la base del pentón, localizada en los vértices, y la fibra que se proyecta desde las bases del pentón. Otras proteínas estructurales de la cápside como las proteínas IIIa, VIII y IX sirven para cementar la cápside y anclar el ADN viral a su interior. En el interior de la cápside el ADN viral se envuelve con proteínas básicas como el polipéptido V, VII y mu. Después de la infección, cuando el ADN viral llega al núcleo de la célula infectada, empieza la expresión de los genes virales. Los primeros genes virales que se expresan corresponden a los genes de la región temprana 1 ("Early" 1, E1). En particular E1a controla la subsecuente expresión del resto de genes virales tempranos (E2, E3 y E4). Las proteínas tempranas codificadas por estos genes preparan a la célula para la replicación viral óptima y codifican las polimerasas para replicar el ADN viral. Después de la replicación del ADN viral se activa el promotor tardío principal ("Major Late Promoter") que controla la producción de un solo ARN tardío que es procesado en múltiples ARNs por poliadenilación y corte-empalme diferenciales. Hay 50 serotipos de adenovirus humanos que se clasifican en seis subgrupos (A a F) según propiedades estructurales y funcionales como la aglutinación de eritrocitos. En terapia génica se ha utilizado preferentemente el adenovirus tipo 5 por estar bien caracterizado molecularmente y por su baja patogenicidad en humanos. De hecho, el 85% de la población ha sido infectada con adenovirus y es seropositiva en cuanto a

la presencia de anticuerpos antiadenovirales. El adenovirus tipo 5, en particular, causa un resfriado en niños que en la mayoría de los casos es asintomático.

El desarrollo de adenovirus como vector de transferencia génica se ha visto potenciado por la construcción de líneas capaces de complementar delecciones de genes virales (Alemany et al., 1999; Zhang, 1999). El prototipo de estas líneas es 293, una línea celular derivada de riñón embrionario humano que contiene parte del genoma adenoviral y expresa los genes virales de la región E1. Esta línea ha permitido la propagación de vectores adenovirales deleccionados en E1. Puesto que los genes de E1 son los primeros en expresarse después de la infección y controlan la expresión de otros genes virales, los vectores sin E1 no deberían expresar otros genes virales y se consideran incompetentes en replicación. En la práctica sin embargo existe un nivel bajo de expresión de E2 y E4 que es suficiente para que las células transducidas sean eliminadas por el sistema inmune. Esto ha afectado al éxito de los vectores deleccionados en E1 en terapias génicas que requieren la persistencia de la expresión del gen introducido. Sin embargo, en cáncer, donde a menudo se busca la expresión transitoria del gen para inducir muerte celular, los vectores deleccionados en E1 se usan comúnmente. Otra región viral a menudo deleccionada es E3. Esta región codifica para proteínas que inhiben la respuesta inmune. Estas funciones no se requieren para la propagación del vector *in vitro* y pueden ser deleccionadas sin la necesidad de líneas celulares que complementen su pérdida. Otra proteína codificada en E3 es la proteína de muerte por adenovirus ("Adenovirus death protein") que tiene un papel en la fase tardía del ciclo viral liberando la progenie de viriones fuera de la célula infectada. Cuando los vectores adenovirales se propagan *in vitro* los viriones se liberan con la ayuda de ciclos de congelación-descongelación por lo que E3 no es necesaria.

Distintos vectores adenovirales deleccionados en E1 se han usado con poco éxito para el tratamiento del cáncer en ensayos clínicos. Se ha

comprobado que la limitación de su eficacia reside en el escaso número de células que el vector alcanza. El gran tamaño de la partícula viral, 80 nm de diámetro, dificulta su difusión y sólo unas pocas capas de células tumorales más allá del punto de inyección o de los vasos sanguíneos son alcanzadas por el vector. Esta limitación es particularmente relevante en estrategias terapéuticas basadas en la introducción de genes citotóxicos o supresores tumorales a pesar de que se ha encontrado un efecto citotóxico colateral en células no transducidas cercanas a las transducidas. Incluso inyectando dosis elevadas múltiples de vector, la mayoría de las células tumorales no se ven afectadas por el vector. En años recientes la propagación selectiva del vector en células tumorales se ha propuesto como una estrategia para solventar esta limitación (Alemany et al., 2000). La replicación viral por sí misma es citopática por lo que no se necesitan genes citotóxicos o supresores tumorales para obtener un efecto antitumoral. En cierto modo el concepto de un adenovirus que se replica selectivamente en células tumorales sin llevar ningún gen no viral pertenece más propiamente al campo de la terapia viral o viroterapia del cáncer que al campo de la terapia génica. Sin embargo puesto que genes citotóxicos, inmunostimuladores o supresores tumorales pueden potenciar la toxicidad selectiva del adenovirus replicativo, dichos genes se han insertado dentro del genoma del adenovirus replicativo. Estos vectores de replicación selectiva enlazan así los conceptos de viroterapia y terapia génica.

La viroterapia del cáncer es muy anterior a la terapia génica. Las primeras observaciones de curaciones de tumores con virus datan de principios del siglo pasado. Ya en 1912 De Pace obtuvo regresiones tumorales tras inocular el virus de la rabia en carcinomas cervicales (De Pace, 1912). Desde entonces muchos tipos de virus se han inyectado en tumores para su tratamiento (Sinkovics and Horvath, 1993). Hay virus que presentan un oncotropismo natural. El grupo de Rommelaere ha liderado el uso de parvovirus autónomos en el tratamiento del cáncer (Dupressoir et al., 1989). Por un mecanismo todavía incierto la replicación de este tipo de virus parece estar ligada a la transformación maligna de la célula. El virus de la estomatitis

vesicular (VSV) ha sido descrito recientemente como oncotrópico (Stojdl et al., 2000). En este caso su oncotropismo se asocia a los efectos antivirales del interferón. El VSV es muy sensible a la inhibición por interferón y las células tumorales a menudo no responden a los efectos del interferón por lo que

5 presentan una respuesta antiviral deficiente. Otro virus que se ha identificado recientemente como oncotrópico es el Reovirus (Norman and Lee, 2000). Las células infectadas reaccionan frente a la producción de ARN de cadena doble (dsRNA) producidas durante la infección con Reovirus y otros virus activando

10 una quinasa dependiente de dsRNA (PKR). La PKR así activada bloquea la síntesis de proteínas al fosforilar la unidad alfa del factor de traducción eIF2. Este bloqueo de la traducción de ARN mensajero bloquea también la traducción de ARN viral y con ello la replicación del virus. Muchos tipos de virus expresan genes que inactivan la PKR pero el Reovirus no. Sin embargo la PKR puede ser inactivada por otras proteínas que se hallan en la vía de

15 transducción de señal de Ras. Por ello en células con Ras activo, como es el caso de muchas células tumorales, el reovirus puede propagarse. Otros virus no muestran un oncotropismo natural sino que se pueden manipular genéticamente para que se repliquen selectivamente en tumores. Por ejemplo el Herpes Simplex virus (HSV) se ha hecho oncotrópico al deleccionar el gen

20 de la ribonucleótido reductasa, una actividad enzimática dispensable en células en proliferación activa como las células tumorales (Markert et al., 2000). Otra delección que resulta en replicación selectiva en Herpes Simplex es la del gen ICP34.5 (Bologan et al., 1994). La proteína ICP34.5 contrarresta el bloqueo de la traducción mediado por PKR y su delección resulta en un

25 oncotropismo por un mecanismo similar al del Reovirus. Recientemente otro virus que se ha manipulado para que presente oncotropismo es el virus Influenza A (Bergmann et al., 2001). La proteína viral NS1 de este virus también contrarresta el bloqueo traduccional por PKR y su delección resulta en un virus que depende de Ras activo. Sin embargo ha sido con adenovirus

30 dónde se han realizado más manipulaciones genéticas para conseguir replicación selectiva en tumores. El papel protagonista de los adenovirus en la terapia génica del cáncer junto con la experiencia acumulada en ensayos

clínicos han contribuido a la popularidad de estos nuevos vectores adenovirales replicativos.

Se han usado dos métodos para restringir la replicación de adenovirus a células tumorales: la sustitución de promotores virales por promotores selectivos de tumor y la delección de funciones virales que no son necesarias en células tumorales (Alemany et al., 2000). En ambas estrategias el gen a regular o mutar preferiblemente es E1a porque controla la expresión de los demás genes virales. Muchos promotores específicos de tejido o de tumor se han usado para controlar la expresión de E1a. Los promotores de la alfa-fetoproteína, antígeno prostático específico (PSA), kallikreína, Muc1 y osteocalcina son algunos ejemplos (Alemany et al., 1999; Hallenbeck et al., 1999; Kurihara et al., 2000; Matsubara et al., 2001; Rodriguez et al., 1997). La estrategia de sustitución de promotores se ha extendido a la regulación de otros genes virales además de E1a como E1b, E2 y E4 (Brunori et al., 2001; Doronin et al., 2001). Con respecto a la estrategia de deleccionar funciones virales que no son necesarias en células tumorales, el primer mutante que se ha propuesto como de replicación selectiva presentaba una delección de E1b-55K. Esta proteína une e inactiva p53 para inducir en la célula infectada la entrada en fase S del ciclo celular e inhibir una apoptosis mediada por p53 que se dispara como consecuencia de esta inducción. Un adenovirus mutado en E1b-55K conocido como dl1520 o Onyx-015 se ha usado para tratar tumores defectivos en p53. Uno de los problemas que se ha observado es una baja capacidad de propagación de este mutante en comparación con el adenovirus 5 tipo salvaje. Una explicación a esta falta de potencia es que la proteína 55K tiene otras funciones además de inactivar p53 como el transporte de ARN viral. Otra mutación realizada en el genoma adenoviral para conseguir replicación selectiva en tumores afecta a los dominios CR1 y CR2 de E1a. Estos dominios de E1a median la unión a las proteínas de la familia del Retinoblastoma (RB). Las proteínas RB bloquean la transición de la fase Go/G1 a la fase S del ciclo celular formando un complejo inhibidor de la transcripción junto con E2F. Cuando E1a se une a RB se libera el factor de

transcripción E2F del complejo RB-E2F y E2F actúa como un activador transcripcional de los genes responsables del paso a la fase S y de genes virales como E2. La liberación de E2F es de este modo un paso clave para la replicación del adenovirus. En células tumorales el ciclo celular está fuera de control debido a que RB está ausente o inactivado por hiperfosforilación y E2F está libre. En estas células la función inactivada de RB de E1a ya no es necesaria. Por ello un adenovirus con una mutación en E1a que impide su unión a RB se puede propagar normalmente en células con RB inactivo. La replicación selectiva de dichos mutantes ya ha sido demostrada (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000). Otros genes virales que interaccionan directamente con p53 o RB como E4 (Dobner et al., 1996) y E4orf6/7 (Schaley et al., 2000), respectivamente, son candidatos a ser deletados para conseguir replicación selectiva en células tumorales sin p53 o sin RB.

La presente invención describe un nuevo tipo de mutación para conseguir replicación selectiva en células tumorales con un defecto genético determinado distinto a las vías de p53 y RB. Al contrario de otras construcciones existentes en el campo, en la presente invención el ADN diana de la mutación no produce ninguna proteína viral sino un ARN y no pertenece a los genes adenovirales tempranos sino a los tardíos.

El defecto genético atacado en la presente invención es la vía de transducción de señal del oncogén Ras, una vía que no ha sido previamente considerada con adenovirus. Muchos receptores de factores de crecimiento activan las proteínas Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras A y K-Ras B) para transducir una señal proliferativa desde el exterior de la célula al núcleo. Las proteínas Ras son pequeñas GTPasas que cuando se unen a GTP son capaces de activar una serie de efectores. La activación de los efectores lleva a la señal mitogénica. Ras se halla mutada a una forma permanentemente activa en el 90% de los tumores de páncreas, 50% de colon, 30% de pulmón y en otras proporciones en muchos otros tipos de tumores. Además de un gran número de tumores con Ras mutado, la vía de Ras se halla activada en otros casos por la activación constitutiva de proteínas que regulan Ras o de los efectores

de la vía de Ras. Por ejemplo el gen c-erbB que codifica el receptor de EGF receptor se sobre-expresa en el 50% de glioblastomas y su homólogo c-erbB2 se sobre-expresa frecuentemente en cáncer de mama y ovario. En general se considera que el 80 % de los tumores presentan la vía de Ras
 5 activada. Muchos de estos tipos de tumores, como es el caso del cáncer de páncreas, necesitan nuevas terapias dada la falta de respuesta a la terapia convencional.

3. Resumen de la invención

10 La presente invención se refiere a la utilización de un adenovirus para el tratamiento del cáncer caracterizado por el hecho que el adenovirus es defectivo en sus ARNs asociados (VA).

También se refiere a la utilización de un adenovirus en la que dicho adenovirus tiene una mutación en la secuencia del gen VAI ó VAII o ambos.

15 Otro objeto de la invención es la utilización en la de un adenovirus y que dicho adenovirus tiene una mutación en las secuencias que controlan la expresión de los ARNs VA.

Otro objeto de la invención es la utilización de un adenovirus en la que dicho adenovirus se inyecta en el tumor, en una cavidad donde se localiza el
 20 tumor o en el torrente sanguíneo de un paciente con cáncer.

Otro objeto de la invención es la utilización de un adenovirus que dicho adenovirus se combina con otras modalidades terapéuticas contra el cáncer como la quimioterapia o la radioterapia.

Aún otro objeto de la presente invención es una composición que
 25 comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA para conseguir replicación selectiva en células tumorales con una vía de Ras activa o refractarias a la acción del interferón.

Aún otro objeto de la presente invención es una composición para utilizar en el tratamiento del cáncer que comprende un adenovirus con

mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA y en uno o más genes del grupo E1a, E1b y E4 para conseguir replicación selectiva en tumores.

5 Aún otro objeto de la presente invención es una composición para utilizar en el tratamiento del cáncer que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA y a su vez promotores que regulan uno o más genes del grupo E1a, E1b y E4 para conseguir replicación selectiva en tumores.

10 Aún otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA para conseguir replicación selectiva en células tumorales y modificaciones en su cápside para aumentar su infectividad o dirigirlo a un receptor presente en una célula tumoral.

15 Aún otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA que le confieren replicación selectiva en células tumorales y que a su vez que contiene otros genes usados comúnmente en el campo de terapia génica del cáncer como activadores de prodrogas, supresores tumorales o inmunoestimuladores.

20 Aún otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un adenovirus humano derivado de un serotipo entre el 1 al 50 con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA que confieren replicación selectiva en células tumorales.

25 La presente invención describe el uso de adenovirus mutantes de los genes VA ARN para el tratamiento del cáncer. La mutación de VA ARN permite conseguir que la replicación del adenovirus esté condicionada a la existencia de una vía de Ras activa o a la falta de activación de PKR por insensibilidad a interferón. La invención se dirige hacia la necesidad de hallar mejores terapias para el cáncer de páncreas, colon, pulmón y otros en tipos de tumores.

La presente invención comprende adenovirus que contienen mutaciones en su genoma que eliminan la función inactivadora de PKR de los ARNs virus-asociados (VA). Existen dos genes que codifican ARNs VA en el genoma del adenovirus, VAI y VAII, localizados aproximadamente a 30 unidades de mapa del genoma viral. Ambos producen un ARN corto (de unos 160 ribonucleótidos) sintetizados por la ARN-polimerasa III en la fase tardía del ciclo viral. Cada ARN VA se pliega formando un bucle que se une a la quinasa dependiente de ARN, la PKR. Con el fin de propagarse el adenovirus usa los VA ARNs para inhibir la PKR pues de otro modo esta quinasa fosforila el factor de traducción de proteínas eIF2 inactivándolo y bloqueando la síntesis general de proteínas. Por ello los mutantes VA descritos en esta invención se propagan mal en células normales. Por el contrario en células donde la PKR ya es inactivada por la vía de Ras, como ocurre en muchas células tumorales, estos mutantes se propagan normalmente. En células que no responden a la infección con adenovirus induciendo la PKR, los mutantes VA también se propagan normalmente.

Las mutaciones de ARNs VA de esta invención pueden afectar a los genes VAI y VAII. Alternativa o simultáneamente las mutaciones pueden afectar los promotores de los genes VAI o VAII o a sus secuencias de terminación transcripcional para impedir su expresión.

Los adenovirus mutantes en VA se propagan y amplifican en líneas celulares con la vía de Ras activa como la línea de carcinoma de páncreas humano NP9. Después de su amplificación en cultivos celulares los mutantes se extraen y purifican siguiendo métodos estándar en el campo de la adenovirología.

El tratamiento del cáncer se realiza por inyección directa del mutante VA dentro del tumor o por administración endovenosa sistémica en pacientes afectados de cáncer usando métodos estándar en el campo de terapia génica con adenovirus.

4. Descripción de las figuras

Los dibujos incluidos en la invención se han anexoado con el propósito de que las características, ventajas, y construcciones de la invención queden claras y se entiendan con detalle. Esos dibujos forman parte de las especificaciones e ilustran las invenciones preferidas pero no deben ser considerados limitativos del ámbito de la invención.

FIGURA 1 Estructura secundaria del ARN VAI del adenovirus serotipo 5 (Ad5). Una estructura de tallos y asas se forma por apareamiento de bases siguiendo las reglas de complementariedad de Watson y Crick. El dominio central es crítico para la función VA y el tallo apical también esta involucrado en la interacción del ARN VAI con la PKR.

FIGURA 2 Secuencia de la región VA Ad5. La secuencia de ADN mostrada corresponde a los pares de bases 10500 a 11100 del genoma del adenovirus serotipo 5. Esta secuencia contiene la región VA (sólo se muestra la cadena con sentido respecto a los genes VA). La secuencia mostrada va desde el par de bases (bp) -118 relativo al inicio de transcripción del gen VAI hasta 64 bp más allá del sitio de terminación de VAI. El gen VAI (160 bp) desde el inicio hasta el final de transcripción está subrayado y en *itálicas*. Una secuencia de 96 bp separa las secuencias codificantes de VAI y VAI. VAI (161 bp) se halla después de VAI y se muestra subrayado en **negrita**.

FIGURA 3 Mecanismo de selectividad de la replicación de adenovirus defectivos en ARNs VA en células con la vía de RAS activa o refractarias a interferón. Mecanismo por el cual los mutantes de ARNs virus-asociados (VA) muestran replicación condicionada a la activación de Ras. La infección adenoviral produce ARNs de cadena doble que inducen la activación de PKR por fosforilación. La PKR activada fosforila el factor de traducción de proteínas eIF2 y lo inactiva, bloqueando así la traducción general de proteínas. Los ARNs VA del adenovirus se unen e inactivan la PKR para contrarrestar esta respuesta antiviral de la célula infectada. Los adenovirus mutantes de ARNs VA no pueden inhibir la PKR e impedir el bloqueo general de la síntesis proteica. Sin embargo por otro lado la activación de la vía oncogénica de Ras

también inhibe la PKR y cuando ésta se halla activa los mutantes VA se propagan normalmente.

FIGURA 4 Efecto de la activación de Ras en la propagación de los mutantes de ARNs VA. Gráfico de la producción de virus en 293 (replicación, día 2). La línea celular 293 presenta bajos niveles de Ras activado. Un plásmido que contiene un cassette de expresión de un mutante dominante negativo de Ras (RasN17) se transfectó en 293 y se evaluó la eficacia de propagación de un adenovirus mutante del ARN VAI (dl331). La inhibición de Ras que puede observarse en el western blot es capaz de inhibir la propagación de dl331. Por el contrario cuando se transfectó 293 con un plásmido que contenía un cassette de expresión de un mutante constitutivamente activo de Ras (RasV12) se observó la activación de Ras por western blot y el aumento de la propagación de dl331.

FIGURA 5 Propagación de un adenovirus mutado en ARN VAI en células con baja (293) o alta (NPA) actividad de RAS. Gráfico del efecto citopático (CPE) cuantificado por BCA (día 5). Comparación de la propagación de mutantes de ARNs VA en células con baja actividad de Ras y células de carcinoma pancreático con elevados niveles de Ras activo. La propagación del adenovirus salvaje Ad5 se usa como control de normalización para corregir las diferencias de infectividad y replicación que no pueden ser adscritas a la mutación VA.

FIGURA 6 Gráfico crecimiento tumoral (volumen +/- S.E.). Tratamiento de tumores con un mutante de ARN VA. Tumores de cáncer de páncreas humano NP9 fueron implantados en ratones inmunosuprimidos (ratones desnudos Balb/c). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 70 - 80 mm³ fueron inyectados con adenovirus mutante de ARN VAI (dl331) o con vehículo control. Después de midió la progresión tumoral (volumen del tumor). Se demuestra el efecto antitumoral del mutante de ARN VA.

30 **5. Descripción detallada de la invención**

A. Estructura de los adenovirus mutados en ARNs Virus-asociados (VA).

La presente invención describe el uso de adenovirus mutados (es decir funcionalmente defectivos) en sus genes que codifican los ARNs virus-asociados (VA) para el tratamiento del cáncer. El tratamiento se basa en la replicación selectiva de los mutantes VA en células con la vía de Ras activa. Además los tumores resistentes a los efectos antivirales del interferón (interferones alfa, beta y gamma) también pueden ser tratados con estos mutantes. Los mecanismos que permiten esta replicación condicionada a Ras activo o a resistencia a interferón se detallan a continuación.

En el citoplasma de células infectadas con adenovirus se detectan grandes cantidades de unos pequeños ARNs que se han llamado asociados al virus o virus-asociados (VA). Estos ARNs están sintetizados por la ARN polimerasa III celular por transcripción de unos genes adenovirales localizados aproximadamente a 30 unidades de mapa del genoma adenoviral. Algunos serotipos de adenovirus sólo contienen un gen VA (los pertenecientes a los subgrupos A y F, y algunos serotipos del subgrupo B) mientras que otros contienen dos genes VA (VAI y VAII presentes en algunos serotipos del subgrupo B y en todos los serotipos del los subgrupos C, D y E). Los ARNs VA tienen unos 160 ribonucleótidos y forman una estructura secundaria caracterizada por tallos de doble cadena y bucles de cadena sencilla (véase FIGURA 1). Este ARN VA compite en su unión a una quinasa de proteínas llamada PKR con otros ARNs de cadena doble producidos durante la infección adenoviral. La PKR es una proteína quinasa cuya actividad fosforilante depende de ARN de doble cadena; sin embargo la unión a ARN VA en lugar de activarla la inhibe. Esta función de los ARNs VA es necesaria para la replicación viral puesto que la PKR activada fosforila el factor de iniciación de la traducción proteica eIF2 inactivándolo y bloqueando la síntesis de proteínas. Por otro lado se ha descrito que PKR puede ser inhibida por Ras (Mundschau and Faller, 1992). Con respecto a la inhibición de PKR, la vía de transducción de Ras que se halla activada en un gran número de tumores es

funcionalmente análoga a los ARNs VA. Conectando estas observaciones la presente invención establece que en células tumorales con la vía de Ras activa las funciones de los ARNs VA pueden ser eliminadas sin afectar a la replicación viral. La invención por ello describe que los mutantes de ARNs VA
5 pueden usarse para el tratamiento de tumores.

El mecanismo de replicación selectiva en tumores de los mutantes VA descrito en el párrafo anterior se basa en que los efectores de Ras inactivan la PKR. En muchos tumores nos encontramos también otro mecanismo por el cual no hay activación de PKR: la falta de respuesta al interferón. La secreción
10 de interferón (IFN) de tipo alfa, beta o gamma es la primera respuesta del sistema inmune innato frente a virus. IFN induce la expresión de PKR (Williams, 1999) y los genes de ARNs VA del adenovirus antagonizan los efectos antivirales del IFN al inhibir la PKR (Kitajewski et al., 1986). En células
15 que no responden a interferón, la PKR no se induce y la cantidad de PKR en el citoplasma se mantiene a niveles basales muy bajos. Los genes de ARNs VA entonces dejan de ser necesarios para permitir la replicación viral. Está bien establecido que las células tumorales presentan defectos en la respuesta a IFN (Stojdl et al., 2000). De hecho un virus que es muy sensible a los efectos inhibitorios de IFN se ha usado para lisar selectivamente células
20 tumorales y tratar tumores (Stojdl et al., 2000). Conectando estas observaciones otra configuración de la presente invención es el uso de adenovirus mutantes de ARNs VA para tratar tumores con defectos en la vía del interferón.

La secuencia de los genes de ARNs VA del adenovirus serotipo 5 se muestra en la figura 2. El gen VAI del adenovirus 5 consta de 160 pares de
25 bases, ocupando desde el par de bases 10620 hasta el 10779 en la secuencia del genoma adenoviral. El gen VAII consta de 161 pares de bases, ocupando desde el par de bases 10876 hasta el 11036. Una configuración de la presente invención contiene una delección dentro de estas secuencias. Otras
30 configuraciones contienen delecciones que afectan a secuencias alrededor de éstas y que controlan la expresión de los genes VA. En particular secuencias

de 30 pares de bases anteriores a los genes VA se han descrito involucradas en la regulación de su expresión (Fowlkes and Shenk, 1980). Otra configuración contiene deleciones de las secuencias posteriores a los genes VA que controlan la terminación de su transcripción por la ARN polimerasa III (Gunnery et al., 1999).

Durante el estudio de la función de los ARNs VA se han construido varios mutantes que eliminan su función (Schneider et al., 1985; Schneider et al., 1984; Thimmappaya et al., 1982). La presente invención establece que los mutantes de genes VA que eliminan su función inhibitoria de PKR pueden ser usados para el tratamiento del cáncer.

Nuevos mutantes de RNAs VA también pueden ser usados para la aplicación descrita en la presente invención. Existen varios métodos para manipular el genoma adenoviral. La construcción de mutantes de VA puede realizarse por ejemplo por mutagénesis dirigida usando protocolos descritos anteriormente en Alemany et al. (2000, 2001) pero en lugar de usar fragmentos adenovirales del hexón o de la fibra allí descritos usando un fragmento que contenga los genes VA. El procedimiento puede ser como sigue: Se obtiene ADN purificado de adenovirus tipo 5 por SDS-proteinasa K usando métodos estándar (Alemany and Zhang, 1999; Graham and Prevec, 1991). Este ADN viral se corta con la enzima restricción Kpn I y un fragmento de 2749 bp (Ad5 bp # 8537 – 11286) que contiene los genes de ARNs VA se purifica por electroforesis en gel. Este fragmento se clona por ligación en el plásmido pUC19 digerido con la misma enzima de restricción. La mutagénesis dirigida para deleccionar cualquiera de las secuencias VA indicadas más arriba se realiza sobre este plásmido usando protocolos comerciales ("Quick Change site-directed mutagenesis kit", Stratagene, La Jolla, CA). El fragmento mutado Kpn I se introduce luego dentro del genoma viral por recombinación homóloga usando un plásmido que contiene el genoma completo del Ad5 digerido parcialmente con Rsr II (la diana en bp 10944 queda reparada por la

recombinación homóloga). Del plásmido resultante se obtiene el mutante VA por transfección en células 293 o en células con la vía de Ras activa.

Otros tipos de mutaciones y manipulaciones genéticas distintas a las mutaciones de los genes de ARNs VA descritas en la presente invención se han realizado para obtener replicación selectiva en tumores (Alemany et al., 2000; Kim, 2000; Kim and McCormick, 1996; Ring, 2002). Estas pueden ser inserciones de promotores que son activos en células tumorales para controlar la expresión de genes virales y deleciones de funciones tempranas ("early E1 y E4) que bloquean las vías de RB o de p53. Una configuración de la presente invención es el uso de mutaciones en los genes de ARNs VA en combinación con esas otras manipulaciones para obtener replicación selectiva en tumores.

En otra configuración de la invención los mutantes de ARNs VA pueden contener modificaciones de su cápside para aumentar su infectividad o dirigirse a receptores presentes en la célula tumoral. Las proteínas de la cápside adenoviral se han modificado genéticamente para incluir ligandos que aumentan la infectividad o que dirigen el virus a un receptor en la célula tumoral (Hemminki et al., 2001; Kasono et al., 1999; Suzuki et al., 2001; Wickham, 2000; Wickham et al., 1995; Wickham et al., 1996; Wickham et al., 1997). Dirigir el adenovirus al tumor también se puede conseguir con ligandos bifuncionales que unen al virus por un lado y al receptor tumoral por otro (Curiel, 1999; Gu et al., 1999; Haisma et al., 2000; Hemminki et al., 2001). Por otro lado para aumentar la persistencia del adenovirus en sangre y con ello aumentar las posibilidades de alcanzar nódulos tumorales diseminados, la cápside puede cubrirse con polímeros como el polietilen-glicol (Alemany et al., 2000; Croyle et al., 2001; Croyle et al., 2000; O'Riordan et al., 1999). Se pueden configurar estas modificaciones en mutantes de ARNs VA.

Otra configuración de la presente invención es el uso de mutantes de ARNs VA de otros serotipos de adenovirus distintos al Ad5. De los más de 50 serotipos de adenovirus humanos, existen por lo menos 47 serotipos en los que la secuencia de los genes de ARNs VA esta bien caracterizada (Ma and Mathews, 1996). La mutación de los genes VA en esos serotipos puede

usarse para obtener replicación condicionada a Ras activo o a resistencia a interferón.

Otra configuración de la presente invención describe el uso de adenovirus mutantes de ARNs VA que contienen otros genes para aumentar su citotoxicidad sobre células tumorales como el gen de la timidina quinasa, citosina deaminasa, genes proapoptóticos, inmunoestimuladores o supresores tumorales.

B. Producción, purificación y formulación de adenovirus mutados en ARNs VA.

Los adenovirus mutantes de ARNs VA se propagan siguiendo métodos estándar en los campos de la adenovirología y los vectores adenovirales (Alemany and Zhang, 1999; Graham and Prevec, 1991). El método preferido de propagación es por infección de una línea celular permisiva a la replicación de mutantes de ARNs VA. Dicha línea tiene un oncogén Ras mutado o activo por ejemplo. La línea de carcinoma pancreático NP9 es un ejemplo de dicha línea. La propagación se realiza del siguiente modo por ejemplo: Las células NP9 se crecen sobre placas de cultivo celular de plástico y se infectan usando 50 partículas virales por célula. Dos días después el efecto citopático que refleja la producción de virus se observa como un arracimamiento de las células. Las células se recogen y se almacenan en tubos. Después de una centrifugación a 1000g durante 5 minutos, el precipitado celular se congela y descongela tres veces para romper las células. El extracto celular resultante se centrifuga a 1000g durante 5 minutos y el sobrenadante con virus se carga encima de un gradiente de cloruro de cesio y se centrifuga durante 1 hora a 35.000g. La banda de virus en el gradiente se carga de nuevo sobre otro gradiente de cloruro de cesio y se centrifuga durante 16 horas a 35.000g. La banda de virus se recoge y se dializa frente a PBS-10% glicerol. El virus dializado se alícuota y almacena a -80°C . La cuantificación de número de

partículas y unidades formadoras de placa se realiza siguiendo protocolos estándar (Mittereder et al., 1996).

5 Tampón fosfato salino con glicerol al 10% es una formulación estándar para el almacenamiento de adenovirus. Sin embargo se han descrito nuevas formulaciones que mejoran la estabilidad del virus (Croyle et al., 2001; Croyle et al., 2001).

C. Utilización de adenovirus mutantes de ARNs VA para el tratamiento del cáncer.

10

La presente invención describe el uso de adenovirus defectivos en sus genes de ARNs VA para tratar el cáncer. El tratamiento se basa en la replicación selectiva de los mutantes de ARNs VA en células con una vía de Ras activa o resistentes a los efectos del interferón.

15

Los protocolos para usar los mutantes VA en el tratamiento del cáncer siguen los mismos procedimientos que los usados en los campos de viroterapia con adenovirus y terapia génica con adenovirus. Existe una amplia experiencia en el uso de adenovirus no replicativos y replicativos en el campo de la terapia génica. En particular adenovirus con mecanismos de replicación selectiva distintos al propuesto en la presente invención han sido usados para tratar el cáncer (Alemany et al., 1999; Fueyo et al., 2000; Ganly et al., 2000; Heise et al., 1997; Heise et al., 1999; Heise et al., 1999; Khuri et al., 2000; Simons and Henderson, 1998). Existen numerosas publicaciones de tratamiento de células tumorales en cultivo, en modelos animales y en ensayos clínicos con pacientes. Para el tratamiento de células en cultivos *in vitro* el adenovirus purificado en cualquiera de las formulaciones descritas más arriba se añade al medio de cultivo para la infección de las células tumorales. Para tratar tumores en modelos animales o en pacientes humanos el adenovirus se puede administrar loco-regionalmente por inyección en el tumor o en una cavidad corporal donde el tumor se localiza o sistémicamente por

20

25

30

inyección en el torrente sanguíneo. Como se ha practicado con otros adenovirus de replicación selectiva, el tratamiento de tumores con los mutantes de ARNs VA descritos objeto de la presente invención se puede combinar con otras modalidades terapéuticas como la quimioterapia o radioterapia.

6. Ejemplos

EJEMPLO 1

10 Un adenovirus mutado en el gen VAI muestra replicación dependiente de Ras.

Para demostrar la dependencia de la replicación de un mutante de ARN VAI (dl331; (Thimmappaya et al., 1982)) en una vía activada de Ras hemos modulado el estado de activación de Ras en células humanas. Aproximadamente 1.0×10^7 células humanas de riñón embrionario (línea 293) se sembraron en una placa de 10 cm de diámetro y se transfectaron con 24 μg de plásmidos que contenían o bien la proteína de fluorescencia verde (GFP), la forma constitutivamente activa de Ras (H-Ras V12) o el dominante negativo de Ras (H-Ras N17). Un protocolo estándar de fosfato cálcico se usó para la transfección (Graham and Prevec, 1991). Cuarenta y ocho horas después de la transfección las células se transfirieron a nuevas placas. Para demostrar el efecto de la transfección de los plásmidos en la vía de Ras se miraron los niveles de expresión y de fosforilación de ERK (un efector de Ras) en un lisado celular por Western-blot. El lisado se obtuvo por incubación con tampón de lisis (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100, 10% glicerol, 5 mM NaF, 100 μM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina) durante 1 hora a 4°C . Después de la centrifugación a 14,000xg, las proteínas del sobrenadante (10 μg por carril determinado por ensayo de Bradford) se separaron electroforéticamente en un gel del 10% poliacrilamida-SDS, y se transfirieron a una membrana de PVDF. La cantidad de ERK y fosfo-ERK se reveló mediante el protocolo de

quimioluminiscencia de Amersham (ECL). Como anticuerpos primarios se usaron un anticuerpo monoclonal (Ab) en contra de ERK (Zymed) o un policlonal en contra de fosfo-ERK (Cell Signaling Tech.). Anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa de rábano se usaron como anticuerpos secundarios. Siguiendo estos procedimientos demostramos que las células 293 no transfectadas tienen un bajo nivel de fosforilación de ERK, indicando una baja actividad de la vía de Ras. La transfección control con GFP no afecta estos resultados. La transfección con H-Ras V12 aumenta la fosforilación de ERK indicando la activación de la vía de Ras. Por el contrario la transfección con H-Ras N17 resulta en la inhibición de la vía de Ras (FIGURA 4 de la invención, panel superior).

Una vez verificada la modulación de la vía de Ras siguiendo los procedimientos anteriores pasamos a demostrar la replicación selectiva de los mutantes de ARNs VA como se describe a continuación. Las células transfectadas como se indica en el párrafo anterior se infectaron con el mutante de ARN VAI dI331 o con adenovirus tipo salvaje usando 10 unidades formadoras de placa por célula. La producción de virus se analizó cada día midiendo la cantidad de adenovirus en el sobrenadante mediante ensayos de formación de placas en 293 (Graham and Prevec, 1991). El adenovirus tipo salvaje se replica de 7 a 10 veces mejor que el mutante VAI en células 293 control o transfectadas con GFP. La activación de la vía de Ras inducida por H-Ras V12 aumentó 10 veces la eficiencia de replicación del mutante VA de modo que su nivel de replicación alcanza el nivel del adenovirus tipo salvaje. Por el contrario la inhibición de la vía de Ras con H-Ras N17 disminuyó la replicación del mutante VA 2 veces. Por lo tanto, comparada con la replicación del adenovirus tipo salvaje, la replicación de un mutante de ARN VAI es 20 veces más dependiente de la activación de la vía de Ras que hemos realizado.

Las células tumorales humanas con la vía de Ras activa permiten la replicación eficiente de un adenovirus mutado en su ARN VAI.

La replicación de un adenovirus mutado en el gen del ARN VAI (dl331) se cuantificó en la línea de cáncer de páncreas humano NP-9 que contiene una mutación en el codón 12 del gen K-Ras (GGT → GAT) (Villanueva et al., 1998). La replicación se estimó por el efecto citopático (CPE) que el virus induce medido como una disminución de la cantidad de proteína en la monocapa celular (método BCA (O'Carroll et al., 2000)). En breve, las células NP-9 se sembraron en placas de 96 pocillos a 30.000 células por pocillo. Al día siguiente las células se infectaron con diluciones seriadas de dl331 o de adenovirus tipo salvaje desde una concentración de 1000 unidades formadoras de placa por célula. Las células infectadas se incubaron durante 5 días y el medio de cultivo se sacó para medir la cantidad de proteína restante en el pocillo. La figura 5 muestra los resultados obtenidos como el porcentaje de cantidad de proteína con respecto a pocillos no infectados frente a la dilución del inóculo viral. La dilución que produce el 50% de mortalidad (50% de reducción del contenido de proteína, IC_{50}) es una estimación de la potencia oncolítica de la preparación inicial de virus. En células con Ras mutado (NP9) la IC_{50} obtenida para el mutante de ARN VAI dl331 y para el adenovirus tipo salvaje fue respectivamente 0.04 y 0.7 indicando un aumento de potencia del mutante de ARN VAI de 18 veces (FIGURA 5, panel superior y línea continua del panel inferior). En células con baja actividad Ras (293) estos valores fueron 0.018 y 0.003 indicando una disminución de potencia del mutante de ARN VAI de 6 veces. En conjunto, los resultados muestran que si comparamos la potencia oncolítica de un mutante de ARN VAI frente al adenovirus tipo salvaje en células con Ras activo o en células con Ras casi inactivo, la activación de Ras potencia la replicación del mutante VAI unas 100 veces.

30

EJEMPLO 3

Un adenovirus mutado en el gen de ARN VAI puede ser utilizado para tratar eficazmente tumores.

A continuación demostramos el efecto antitumoral de un adenovirus mutante de ARN VAI (dl331). Se realizó un experimento *in vivo* con ratones atímicos de la cepa Balb/c que contenían tumores con una vía de Ras activada (NP9). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las directrices de FELASA ("Federation of European Laboratory Animal Science Associations"). Un total de 1.2×10^7 células tumorales de la línea NP-9 cells se inyectaron subcutáneamente en cada flanco posterior del ratón. Después de 15 días los tumores formados (que alcanzan 70-80 mm³) se distribuyeron en los distintos grupos experimentales (n=10 por grupo). Los tumores del grupo control recibieron dos inyecciones intratumorales de tampón salino (2 x 10 µl). Los del grupo tratado con el mutante VA recibieron dos inyecciones intratumorales (2 x 10 µl) de dl331 (10⁹ partículas virales por tumor). Se midieron los tumores cada dos días y su volumen se estimó según la fórmula: $V \text{ (mm}^3\text{)} = A \text{ (mm)} \times B^2 \text{ (mm}^2\text{)} \times \pi/6$, en donde B es la longitud transversal. La figura 6 muestra el volumen tumoral respecto al inicio del tratamiento (día 0). Los resultados se presentan como media \pm S.E.M. La existencia de diferencias significativas entre los resultados se calculó usando un ensayo no paramétrico de datos no apareados de Mann-Whitney. Las curvas de crecimiento se compararon usando un análisis de la variancia. Los resultados se consideraron significativos si $p < 0.05$. Los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL). Existe una diferencia significativa entre el tamaño tumoral a días 16 y 21. Los tumores tratados con el mutante de ARN VAI dl331 mostraron regresión.

7. REFERENCIAS

Alemaný, R., Balague, C. and Curiel, D.T., Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol*, 18, 723-727 (2000).

- Alemaný, R. and Curiel, D.T., CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther*, 8, 1347-53. (2001).
- 5 Alemaný, R., Gomez-Manzano, C., Balague, C., Yung, W.K., Curiel, D.T., Kyritsis, A.P. and Fueyo, J., Gene therapy for gliomas: molecular targets, adenoviral vectors, and oncolytic adenoviruses. *Exp Cell Res*, 252, 1-12 (1999).
- 10 Alemaný, R., Lai, S., Lou, Y.C., Jan, H.Y., Fang, X. and Zhang, W.W., Complementary adenoviral vectors for oncolysis. *Cancer Gene Ther*, 6, 21-5 (1999).
- Alemaný, R., Suzuki, K. and Curiel, D.T., Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol*, 81 Pt 11, 2605-9. (2000).
- Alemaný, R. and Zhang, W., *Oncolytic adenoviral vectors*, p. 395-412, Humana Press, Totowa, NJ. (1999).
- 15 Bergmann, M., Romirer, I., S  chet, M., Fleischhacker, R., Garcia-Sastre, A., Palese, P., Wolff, K., Pehamberger, H., Jakesz, R. and Muster, T., A genetically engineered influenza A virus with Ras-dependent oncolytic properties. *Cancer Res*, 61, 8188-93. (2001).
- 20 Bolovan, C.A., Sawtell, N.M. and Thompson, R.L., ICP34.5 mutants of herpes simplex virus type 1 strain 17syn+ are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. *J Virol*, 68, 48-55. (1994).
- 25 Brunori, M., Malerba, M., Kashiwazaki, H. and Iggo, R., Replicating adenoviruses that target tumors with constitutive activation of the wnt signaling pathway. *J Virol*, 75, 2857-65. (2001).
- Croyle, M.A., Cheng, X., Sandhu, A. and Wilson, J.M., Development of novel formulations that enhance adenoviral-mediated gene expression in the lung in vitro and in vivo. *Mol Ther*, 4, 22-8. (2001).

- Croyle, M.A., Cheng, X. and Wilson, J.M., Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy. *Gene Ther*, 8, 1281-90. (2001).
- 5 Croyle, M.A., Chirmule, N., Zhang, Y. and Wilson, J.M., "Stealth" adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung. *J Virol*, 75, 4792-801. (2001).
- 10 Croyle, M.A., Yu, Q.C. and Wilson, J.M., Development of a rapid method for the PEGylation of adenoviruses with enhanced transduction and improved stability under harsh storage conditions. *Hum Gene Ther*, 11, 1713-22. (2000).
- Curiel, D.T., Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann N Y Acad Sci*, 886, 158-71 (1999).
- De Pace, N., Sulla scomparsa di un enorme cranco vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia*, 9, 82-89 (1912).
- 15 Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S. and Shenk, T., Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science*, 272, 1470-3 (1996).
- Doronin, K., Kuppuswamy, M., Toth, K., Tollefson, A.E., Krajcsi, P., Krougliak, V. and Wold, W.S., Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy. *J Virol*, 75, 3314-24. (2001).
- 20 Dupressoir, T., Vanacker, J.M., Cornelis, J.J., Duponchel, N. and Rommelaere, J., Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 49, 3203-8. (1989).
- 25 Fowlkes, D.M. and Shenk, T., Transcriptional control regions of the adenovirus VAI RNA gene. *Cell*, 22, 405-13. (1980).
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P.S., McDonnell, T.J., Mitlianga, P., Shi, Y.X., Levin, V.A., Yung, W.K. and Kyritsis, A.P., A mutant

oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti- glioma effect in vivo. *Oncogene*, 19, 2-12 (2000).

- Ganly, I., Kirn, D., Eckhardt, G., Rodriguez, G.I., Soutar, D.S., Otto, R., Robertson, A.G., Park, O., Gulley, M.L., Heise, C., Von Hoff, D.D., Kaye, S.B.
 5 and Eckhardt, S.G., A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 6, 798-806. (2000).

Graham, F.L. and Prevec, L., *Manipulation of adenoviral vectors*, p. 109-128, Humana Press, Clifton, N.J. (1991).

- 10 Gu, D.L., Gonzalez, A.M., Printz, M.A., Doukas, J., Ying, W., D'Andrea, M., Hoganson, D.K., Curiel, D.T., Douglas, J.T., Sosnowski, B.A., Baird, A., Aukerman, S.L. and Pierce, G.F., Fibroblast growth factor 2 retargeted adenovirus has redirected cellular tropism: evidence for reduced toxicity and enhanced antitumor activity in mice. *Cancer Res*, 59, 2608-14 (1999).

- 15 Gunnery, S., Ma, Y. and Mathews, M.B., Termination sequence requirements vary among genes transcribed by RNA polymerase III. *J Mol Biol*, 286, 745-57. (1999).

- Haisma, H.J., Grill, J., Curiel, D.T., Hoogeland, S., van Beusechem, V.W., Pinedo, H.M. and Gerritsen, W.R., Targeting of adenoviral vectors through a
 20 bispecific single-chain antibody. *Cancer Gene Ther*, 7, 901-4 (2000).

Hallenbeck, P.L., Chang, Y.N., Hay, C., Golightly, D., Stewart, D., Lin, J., Phipps, S. and Chiang, Y.L., A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther*, 10, 1721-33 (1999).

- 25 Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., Hawkins, L. and Kirn, D., An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med*, 6, 1134-9. (2000).

Heise, C., Sampson-Johannes, A., Williams, A., McCormick, F., Von Hoff, D.D. and Kim, D.H., ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med*, 3, 639-45 (1997).

- 5 Heise, C.C., Williams, A., Olesch, J. and Kim, D.H., Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects. *Cancer Gene Ther*, 6, 499-504 (1999).
- 10 Heise, C.C., Williams, A.M., Xue, S., Propst, M. and Kim, D.H., Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res*, 59, 2623-8. (1999).
- Hemminki, A., Dmitriev, I., Liu, B., Desmond, R.A., Alemany, R. and Curiel, D.T., Targeting oncolytic adenoviral agents to the epidermal growth factor pathway with a secretory fusion molecule. *Cancer Res*, 61, 6377-81. (2001).
- 15 Kasono, K., Blackwell, J.L., Douglas, J.T., Dmitriev, I., Strong, T.V., Reynolds, P., Kropf, D.A., Carroll, W.R., Peters, G.E., Bucy, R.P., Curiel, D.T. and Krasnykh, V., Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res*, 5, 2571-9 (1999).
- 20 Khuri, F.R., Nemunaitis, J., Garly, I., Arseneau, J., Tannock, I.F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R.H., Heise, C., Randlev, B., Gillenwater, A.M., Bruso, P., Kaye, S.B., Hong, W.K. and Kim, D.H., a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med*, 6, 879-85. (2000).
- 25 Kim, D., Replication-selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aimed at genetic targets in cancer. *Oncogene*, 19, 6660-9. (2000).

Kim, D.H. and McCormick, F., Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol Med Today*, 2, 519-27 (1996).

Kitajewski, J., Schneider, R.J., Safer, B., Munemitsu, S.M., Samuel, C.E., Thimmappaya, B. and Shenk, T., Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. *Cell*, 45, 195-200. (1986).

- 5 Kurihara, T., Brough, D.E., Kovesdi, I. and Kufe, D.W., Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest*, 106, 763-71. (2000).

Ma, Y. and Mathews, M.B., Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: a phylogenetic approach. *J Virol*, 70, 5083-99. (1996).

- 10 Markert, J.M., Medlock, M.D., Rabkin, S.D., Gillespie, G.Y., Todo, T., Hunter, W.D., Palmer, C.A., Feigenbaum, F., Tornatore, C., Tufaro, F. and Martuza, R.L., Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther*, 7, 867-74 (2000).

- 15 Matsubara, S., Wada, Y., Gardner, T.A., Egawa, M., Park, M.S., Hsieh, C.L., Zhau, H.E., Kao, C., Kamidono, S., Gillenwater, J.Y. and Chung, L.W., A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res*, 61, 6012-9. (2001).
- 20

Mittereder, N., March, K.L. and Trapnell, B.C., Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol*, 70, 7498-509 (1996).

- 25 Mundschau, L.J. and Faller, D.V., Oncogenic Ras induces an inhibitor of double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2 alpha-kinase activation. *J Biol Chem*, 267, 23092-8. (1992).

Norman, K.L. and Lee, P.W., Reovirus as a novel oncolytic agent. *J Clin Invest*, 105, 1035-8. (2000).

O'Carroll, S.J., Hall, A.R., Myers, C.J., Braithwaite, A.W. and Dix, B.R., Quantifying adenoviral titers by spectrophotometry. *Biotechniques*, 28, 408-10, 412 (2000).

- 5 O'Riordan, C., Lachapelle, A., Delgado, C., Parkes, V., Wadsworth, S., Smith, A. and Francis, G., PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*, 10, 1349-1358 (1999).

Ring, C.J., Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. *J Gen Virol*, 83, 491-502. (2002).

- 10 Rodriguez, R., Schuur, E.R., Lim, H.Y., Henderson, G.A., Simons, J.W. and Henderson, D.R., Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res*, 57, 2559-63 (1997).

- 15 Roth, J.A. and Cristiano, R.J., Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst*, 89, 21-39 (1997).

Schaley, J., O'Connor, R.J., Taylor, L.J., Bar-Sagi, D. and Hearing, P., Induction of the cellular E2F-1 promoter by the adenovirus E4-6/7 protein. *J Virol*, 74, 2084-93. (2000).

- 20 Schneider, R.J., Safer, B., Munemitsu, S.M., Samuel, C.E. and Shenk, T., Adenovirus VAI RNA prevents phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit subsequent to infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4321-5. (1985).

Schneider, R.J., Weinberger, C. and Shenk, T., Adenovirus VAI RNA facilitates the initiation of translation in virus- infected cells. *Cell*, 37, 291-8. (1984).

- 25 Shenk, T., *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication*, Third edition ed., p. 2111-2148, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1996).

Simons, J. and Henderson, D., A phase I study of the intraprostatic injections of CN706, a prostate-specific antigen gene-regulated cytolytic adenovirus in patients with locally recurrent cancer following definitive radiotherapy. *Human*

Gene Therapy Protocol 99802-236. National Institutes of Health. Recombinant DNA Advisory Committee. (1998).

Sinkovics, J. and Horvath, J., New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology*, 36, 193-214 (1993).

- 5 Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N. and Bell, J.C., Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med*, 6, 821-5. (2000).

- 10 Suzuki, K., Fueyo, J., Krasnykh, V., Reynolds, P.N., Curiel, D.T. and Alemany, R., A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. *Clin Cancer Res*, 7, 120-6. (2001).

Thimmappaya, B., Weinberger, C., Schneider, R.J. and Shenk, T., Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell*, 31, 543-51. (1982).

- 15 Villanueva, A., Garcia, C., Paules, A.B., Vicente, M., Megias, M., Reyes, G., de Villalonga, P., Agell, N., Lluís, F., Bachs, O. and Capella, G., Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 17, 1969-78. (1998).

Wickham, T.J., Targeting adenovirus. *Gene Ther*, 7, 110-4 (2000).

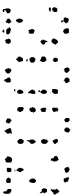
- 20 Wickham, T.J., Carrion, M.E. and Kovesdi, I., Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther*, 2, 750-6 (1995).

Wickham, T.J., Roelvink, P.W., Brough, D.E. and Kovesdi, I., Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat Biotechnol*, 14, 1570-3 (1996).

- 25 Wickham, T.J., Tzeng, E., Shears LL, n., Roelvink, P.W., Li, Y., Lee, G.M., Brough, D.E., Lizonova, A. and Kovesdi, I., Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol*, 71, 8221-9 (1997).

Williams, B.R., PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, 18, 6112-20. (1999).

Zhang, W.W., Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther*, 6, 113-38. (1999).



8. REIVINDICACIONES.

- 1- La utilización de un adenovirus para el tratamiento del cáncer caracterizado por el hecho que el adenovirus es defectivo en sus ARNs virus asociados (VA).
- 5 2- Utilización según la reivindicación 1 en la que dicho adenovirus tiene una mutación en la secuencia del gen VAI ó VAII o ambos.
- 3- Utilización según la reivindicación 1 en la que dicho adenovirus tiene una mutación en las secuencias que controlan la expresión de los ARNs VA.
- 10 4- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que dicho adenovirus se inyecta en el tumor, en una cavidad donde se localiza el tumor o en el torrente sanguíneo de un paciente con cáncer.
- 5- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que dicho adenovirus se combina con otras modalidades terapéuticas
- 15 contra el cáncer como la quimioterapia o la radioterapia.
- 6- Una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA para conseguir replicación selectiva en células tumorales con una vía de Ras activa o refractarias a la acción del interferón.
- 20 7- Una composición para utilizar según las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA y en uno o más genes del grupo E1a, E1b y E4 para conseguir replicación selectiva en tumores.
- 8- Una composición para utilizar según las reivindicaciones 1 a 3 que
- 25 comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA y a su vez promotores que regulan uno o más genes del grupo E1a, E1b y E4 para conseguir replicación selectiva en tumores.
- 9- Una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA para conseguir replicación

selectiva en células tumorales y modificaciones en su cápside para aumentar su infectividad o dirigirlo a un receptor presente en una célula tumoral.

- 5 10-Una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA que le confieren replicación selectiva en células tumorales y que a su vez que contiene otros genes usados comúnmente en el campo de terapia génica del cáncer como activadores de prodrogas, supresores tumorales o inmunoestimuladores.
- 10 11-Una composición que comprende un adenovirus humano derivado de un serotipo entre el 1 al 50 con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA que confieren replicación selectiva en células tumorales.

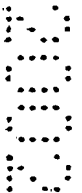


FIGURA 1

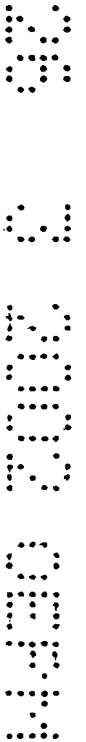
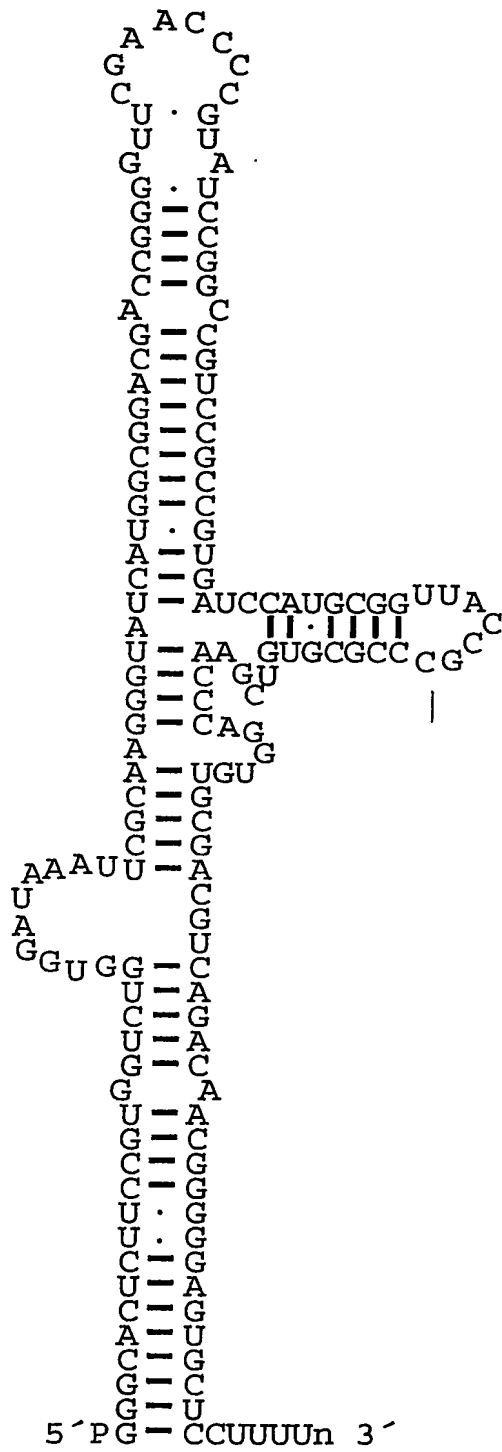


FIGURA 2.

CGGACGCGGT TCCAGATGTT GCGCAGCGGC AAAAAGTGCT CCATGGTCTGG
GACGCTCTGG CCGGTCAGGC GCGCGCAATC GTTGACGCTC TAGACCGTGTC
AAAAGGAGAG CCTGTAAGCG GGCACTCTTC CGTGGTCTGG TGGATAAAAT
CGCAAGGGTA TCATGGCGGA CGACCGGGGT TCGAGCCCCG TATCCGGCCG
TCCGCCGTGA TCCATGCGGT TACCGCCCCG GTGTGGAACC CAGGTGTGCG
ACGTCAGACA ACGGGGAGT GCTCCTTTTG GCTTCCTTCC AGGCGCGGCG
GCTGCTGCGC TAGCTTTTTT GGCCACTGGC CGCGCGCAGC GTAAAGCGGTT
AGGCTGGAA GCGAAAGCAT TAAGTGGCTC GCTCCCTGTA GCCGGAGGGT
TATTTTCCAA GGGTTGAGTC GCGGACCCC CGGTTGAGT CTCGGACCCG
CCGGACTGCG GCGAACGGG GTTGCCTCC CCGTCATGCA AGACCCCGCT
TGCAAATTC TCCGGAACA GGGACGAGCC CCTTTTTTTC TTTTCCCAGA
TGCATCCGGT GCTGCGGCAG ATGCGCCCCC CTCCTCAGCA GCGGCAAGAG

FIGURA 3.

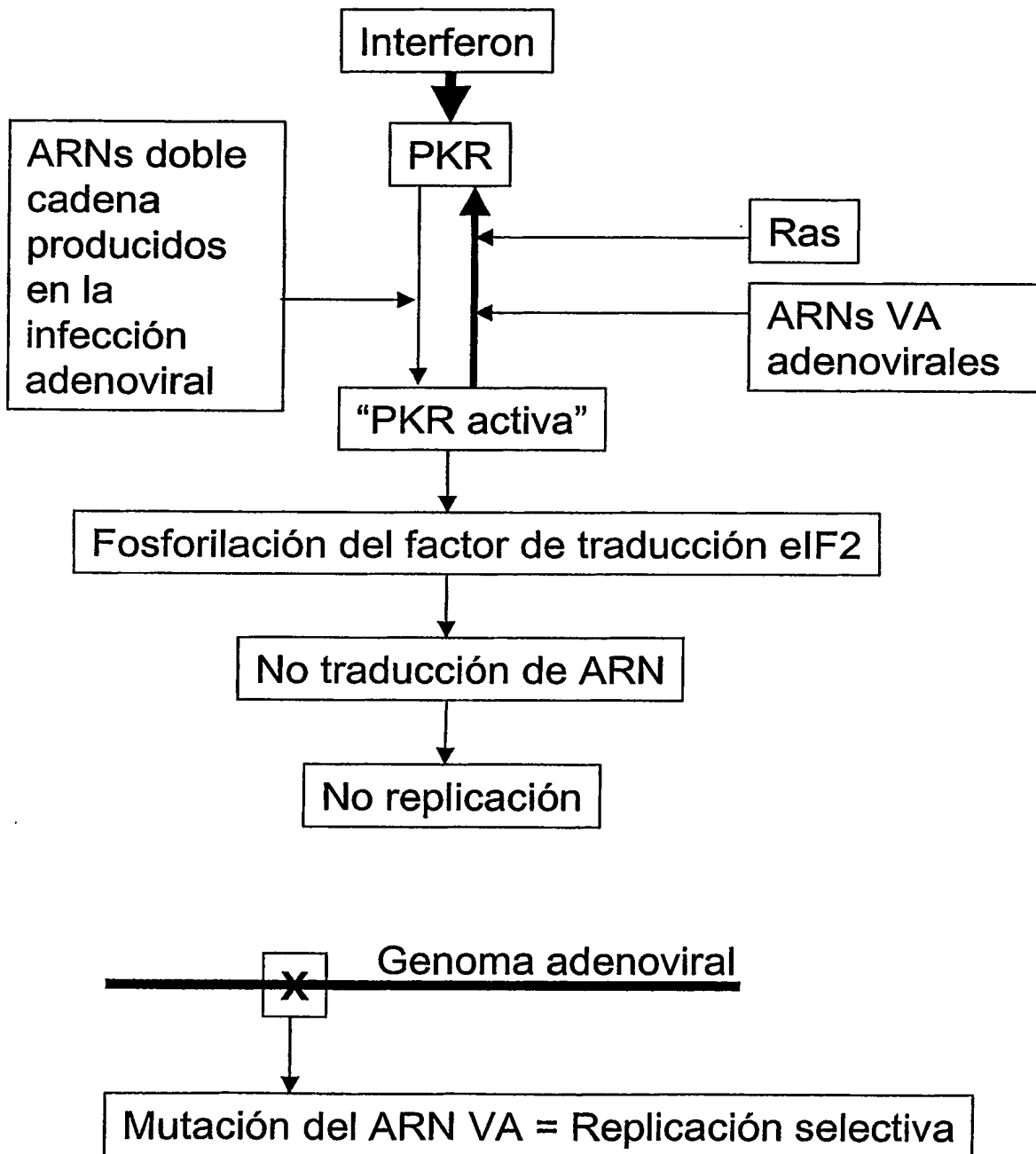


FIGURA 4.

Transfección de 293 con {
H-ras V12 (constitutivamente activo)
H-ras N17 (dominante negativo)

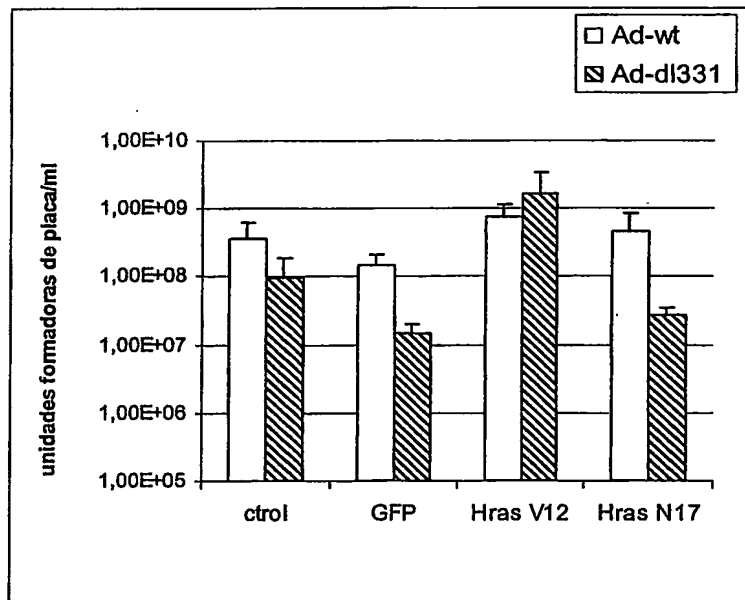
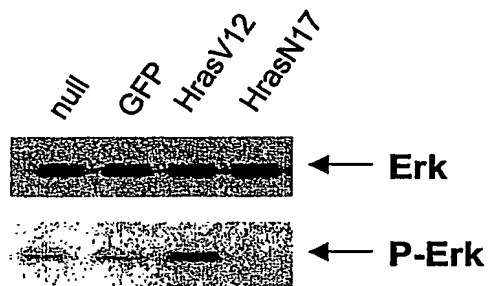


FIGURA 5.

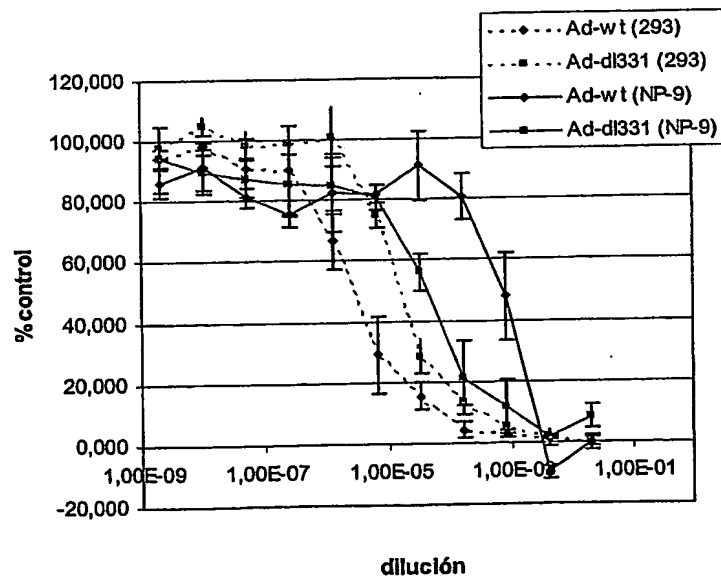
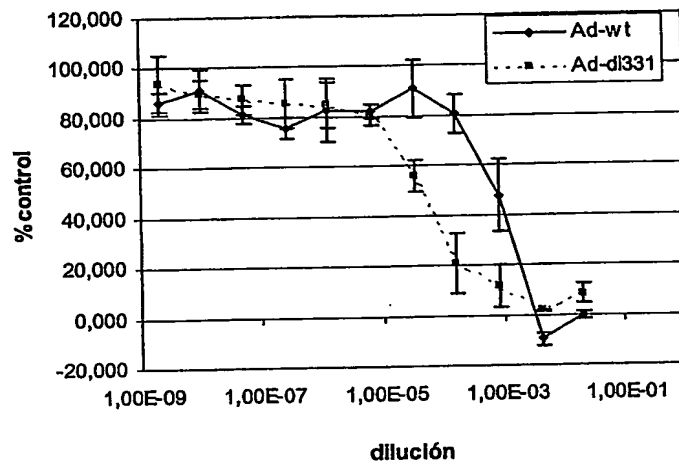
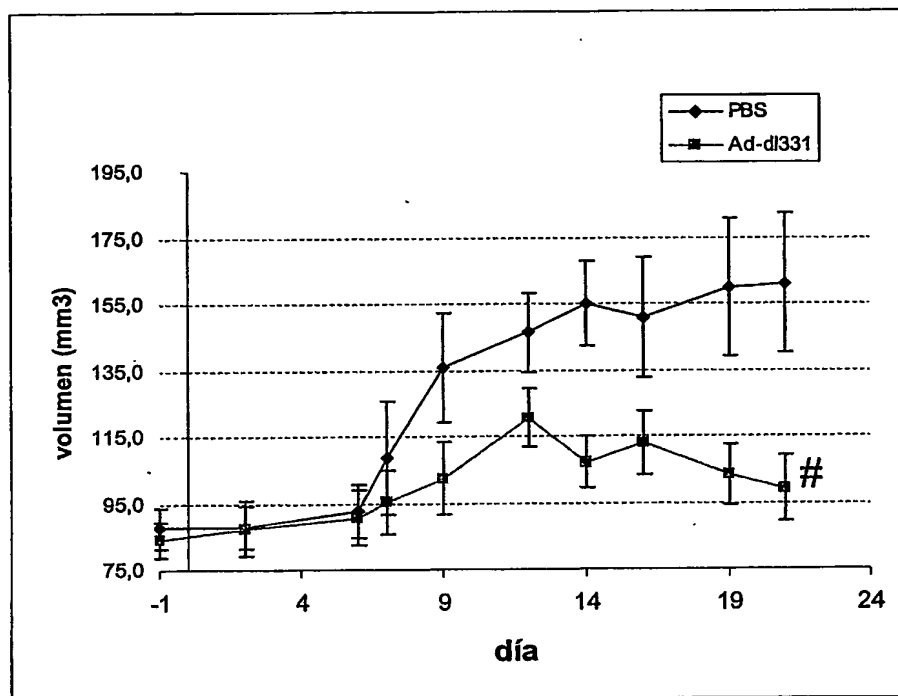


FIGURA 6.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.